

## PLAZEMSKA STERILIZACIJA ali kako z vakuumom ustaviti širjenje smrtonosnih bolezni, npr. antraks

M. Mozetič<sup>1</sup>, T. Mozetič<sup>2</sup> in P. Panjan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Inštitut za tehnologijo površin in optoelektroniko, Teslova 30, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Srednja zdravstvena šola, Poljanska 61, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Institut "Jožef Stefan", Jamova 30, 1000 Ljubljana

### ABSTRACT

Basic mechanisms of plasma sterilization are presented. The sterilising action of plasma is threefold: killing microorganisms by UV radiation, chemical distortion, and local thermal treatment. All three modes of plasma treatment of microorganisms are briefly described. Different methods for sterilization of large venting systems are compared and discussed.

### POVZETEK

Prikazujemo osnovne mehanizme plazemske sterilizacije. Plazma ubija in razgrajuje mikroorganizme z UV-sevanjem, kemijsko razgradnjo in lokalnim ogrevanjem. V prispevku kratko opišemo vse tri načine delovanja plazme na mikroorganizme in ugotovljamo primerrost različnih metod za sterilizacijo večjih prezračevalnih sistemov.

### 1 Uvod

Poskusno trosenje bakterij antraksa, ki smo mu pričla v zadnjih mesecih, je samo podkrepilo prizadevanja raziskovalcev, da razvijejo metode za sterilizacijo večjih količin plinov. Za širjenje epidemije so namreč najnevarnejše tiste bakterije, ki se prenašajo po zraku. Problem ni nov. V prezračevalnih sistemih vselej obstaja možnost raznosa bakterij po poslopih. Velike težave imajo na primer v bolnišnicah, kjer po nekaterih podatkih zbolí desetina pacientov za boleznimi, zaradi katerih se sploh niso prišli zdraviti. Še usodnejši bi lahko bil raznos bakterij v prezračevalnih sistemih velikih poslopij - podzemске železnice na primer.

Za sterilizacijo se sedaj največ uporabljata termična in kemična metoda. Pri termični sterilizaciji izpostavimo vzorce visoki temperaturi - navadno uporabimo za prenos toplote vodno paro, ki je ogreta na okoli 130 °C. Voda je odličén medij za prenos toplote, saj je izparilna toplota izredno visoka. Tekočo vodo s primernim grelnikom uparimo, pare pa potem kondenzirajo na površini vzorcev, pri čemer se sprosti izparilna toplota. Tako je prenos toplote bistveno hitrejši, kot če bi ogrevali vzorce s suhim zrakom. Pomanjkljivost metode je prav visoka temperatura - mnogi vzorci je ne prenesejo. Predstavljajmo si samo, da bi poskusili s to metodo sterilizirati živila - vzorci bi se preprosto skuhalí. Prav tako metoda ni primerna za sterilizacijo velikih prezračevalnih sistemov, saj jih je praktično nemogoče ogreti na 130 °C.

Druga metoda je kemična. Vzorce izpostavimo zelo strupenemu plinu. Najboljši je etilen oksid (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>). Pri tem ni treba vzorcev dodatno ogrevati, saj je plin izredno strupen in deluje že pri sobni temperaturi. Tudi ta metoda ni primerna za sterilizacijo prezračevalnih sistemov, ker bi poleg bakterij pomrla še vsa druga bitja, ki pridejo v stik s plinom. Nesreče te vrste se dogajajo tudi v bolnišnicah!

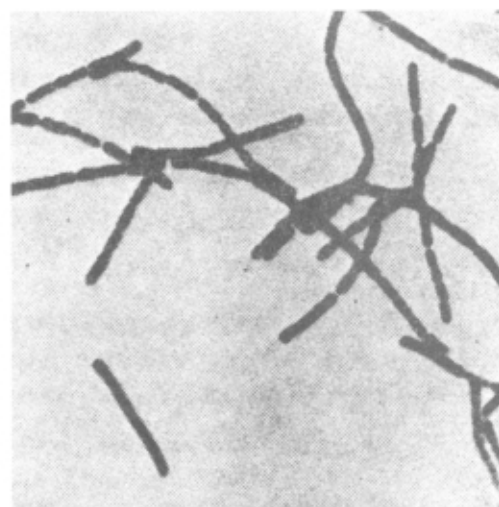
Sterilizacijo lahko dosežemo z različnimi sevanji. Na voljo so vsa sevanja, katerih osnovni kvanti imajo zadostno energijo - nad 4 eV. Pri elektromagnetnem

sevanju lahko uporabimo UV, rentgenske in γ-žarke. V praksi se največ uporablja UV-sevanje, saj poznamo močne izvire: nizekotlačne plazme. Poleg elektromagnetnega sevanja lahko uporabimo tudi curke hitrih delcev. Največ se uporabljajo elektroni, pospešeni do energije okoli 1 MeV. Sterilizacijo s sevanjem največ uporabljajo v živilski industriji, medtem ko za uničevanje bakterij v večjih sistemih ni primerna, saj je s to metodo praktično nemogoče enakomerno obdelati velike površine.

V zadnjem času so raziskovalci ugotovili, da bi lahko prednosti termičnega, kemijskega in sevalnega načina sterilizacije združili tako, da bi kot sterilizacijski medij uporabili plazmo. Ta je namreč močan izvir UV-sevanja, obenem pa v njej nastajajo z vidika mikroorganizmov zelo strupeni radikali, ki so bolj ali manj kratkoživi.

### 2 Struktura bakterij

Predno opišemo mehanizme sterilizacije v plazmi, si oglejmo strukturo bakterij. Bakterije so preprosta in dobro raziskana enocelična bitja. Sestavljena so iz celične membrane in notranjosti, v kateri so organi in proteini /1/. Nekatere bakterije so obdane z ovojnico iz hitina (vrsta beljakovine) in mureina, ki je polisaharid /2/. Zaradi te ovojnice so bakterije še posebej neobčutljive na zunanje vplive in lahko v latentnem stanju preživijo več let v karseda neugodnih razmerah. Verjetno ni treba posebej poudariti, da je sterilizacija takšnih bakterij še posebej zahtevna. Številne bakterije



Slika 1: Bakterije antraksa. Fotografijo smo vzeli iz knjige H. Hren - Vencelj, Mikrobiologija in epidemiologija, DDU Univerzum, Ljubljana (1984), 127.

so sposobne tvoriti tako imenovane endospore /3/. To niso navadne spore, ki so za razmnoževanje, ampak stanje bakterije, ki je pomembno za preživetje v ekstremnih razmerah. Endospore se razvijejo znotraj celice. Zgrajene so iz molekul DNA, majhne količine citoplazme in debele celične stene. Nekatere vrste takšnih bakterij preživijo tudi v zelo "surovih" razmerah, npr. celo uro v vreli vodi pri 100 °C, vroči pečici, zamrznjene v ledu lahko preživijo desetletja ali celo stoletja, visoko starost pa lahko dočakajo tudi v jezerskih usedlinah in podobnih biotopih. Verjetno ni treba posebej poudarjati, da med tovrstne bakterije spadajo tudi bakterije vraničnega prisada. Spadajo v rod *Bacillus*, kar pomeni, da so celice ovalne oblike, ki se rade združujejo v bisernim ogrlicam podobne strukture. Fotografija bakterij antraksa je prikazana na sliki 1.

### 3 Plazemska sterilizacija

S plazemsko sterilizacijo so se pričeli ukvarjati šele v prejšnjem desetletju. Prvi poskusi so bili opravljeni z vodikovim peroksidom. Očitno gre torej za mehak prestop iz čiste kemijske sterilizacije v kombinirano plazemsko. Vodikov peroksid je močan oksidant in že sam brez plazme dober sterilizent. Plazmo so uporabili predvsem za detoksifikacijo sistema po opravljeni sterilizaciji s peroksidom.

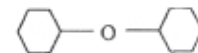
Kasneje so se raziskavam pridružili vakuumisti, predvsem plazemski kemiki in fiziki, in plazemska sterilizacija je doživela nov zagon. Za začetek so ugotovili, da lahko podobne ali boljše uspehe kot s peroksidom dosežejo z različnimi popolnoma netoksičnimi plini: voda, kisik, vodik, argon, helij, dušik. Ugotovili so, da je hitrost in učinkovitost sterilizacije močno odvisna od plazemskih parametrov, kot so temperatura elektronov, gostota pozitivnih in negativnih ionov, gostota metastabilnih atomov in molekul, vrsta in koncentracija radikalov...

Danes je plazemska sterilizacija ena najbolj intenzivnih raziskovalnih področij. Na tem mestu citiramo samo nekatere publikacije, objavljene v letu 2001 /4-15/. Oglejmo si osnovne mehanizme, ki omogočajo sterilizacijo v plazmi!

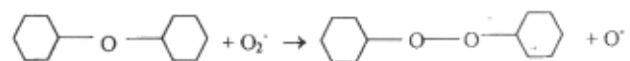
- **Radiacijske poškodbe.** Plazma je močan izvir UV-sevanja. Absorpcija UV-žarkov v tkivu povzroča razpad kompleksnih organskih molekul in s tem počasno uničevanje živega tkiva. Z UV-obsevanjem pa je žal težko odstraniti razpadne produkte, ki so lahko tudi toksični. Radiacijske poškodbe povzročajo tudi obstreljevanje vzorcev z ioni, vendar pa je značilna kinetična energija ionov prenizka, da bi prodrli skozi bakterijsko ovojnico.
- **Kemijske poškodbe.** Plazma je vir različnih vzbujenih molekul in radikalov, ki so kemijsko zelo aktivni. Kot primer si oglejmo kisikovo plazmo. V njej nastajajo pozitivni in negativni ioni, enoelektronsko vzbujene molekule, ozon in nevtralni kisikovi atomi. Nekateri delci (npr. negativni ioni) se kemijsko vežejo na kompleksne organske molekule in povzročajo njihov razpad na manjše molekule. Nevtralni kisikovi atomi se navadno ne vežejo na molekule, ampak povzročijo takojšnjo oksidacijo. Reakcijski produkt je CO in H<sub>2</sub>O, ki se v vakuumu desorbirata s površine. Proces je podoben gorenju, le da poteka oksidacija že pri sobni temperaturi.

- **Termične poškodbe.** Mnogi plazemski delci imajo precejšnjo potencialno energijo. Pri relaksaciji delcev na površini se sprošča precejšnja energija. Druga, še pomembnejša metoda ogrevanja bakterije je oksidacija s kisikovimi atomi (glej zgornjo alinejo), ki je izredno eksotermna reakcija. Bakterija v reaktivni plazmi zato v hipu (pogosto manj kot 1 s) preprosto zgore. Težje je ogreti bakterije v porah in drugih nedostopnih mestih.

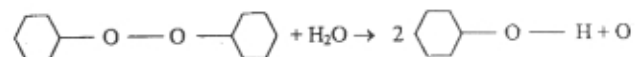
Podrobneje si oglejmo primer kemijskega jedkanja bakterijske ovojnice v kisikovi plazmi! V zunanjem ovoju endospor so ogljikovi obroči vezani s kisikovo vezjo:



Anionski radikal O<sub>2</sub><sup>-</sup> iz plazme reagira z vezjo:



Nastala struktura reagira z molekulo vode:



Kompleksna molekula tako razpade na dve manjši. Nastali kisikov atom lahko spet reagira z negativnim ionom, kar bi lahko pomenilo vzdrževanje cikla, dokler se atomi ne izgubijo za kakšno drugačno reakcijo. Razmerje med številom razcepljenih vezi in adsorbiranih radikalov O<sub>2</sub><sup>-</sup> naj bi bilo po trditvi avtorjev originalnega članka /13/ kar 100 do 1000. Morebiti so avtorji spregledali še kakšno drugo možnost cepitve vezi, vsekakor pa opisani primer lepo demonstrira kemijsko plazemsko razgradnjo celične stene mikrobov.

Oglejmo si še primer termičnega uničevanja mikrobov v plazmi. Temperatura plina je sobna, ogrevamo le bakterije! V prvem približku vzamemo bakterijo za ovalno tvorbo, ki je na neki podlagi. V tem primeru je toplotni stik med bakterijo in podlago zanemarljiv. Bakterijo obdelajmo s plazmo, kakršno sicer uporabljamo za razmaščevanje elektronskih komponent in plazemsko aktivacijo /16, 17/. Gre za visoko disociirano kisikovo plazmo, ki jo ustvarimo v RF- ali MW-razelektrivti. Gostota toka kisikovih atomov (j) na površino bakterije je reda 10<sup>24</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Verjetnost za oksidacijo (reakciji C<sub>org</sub> + O → CO in 2H<sub>org</sub> + O → H<sub>2</sub>O) je pri sobni temperaturi med 0,01 in 0,1 /18/. Z indeksom org smo označili organsko vezana ogljik in vodik. Reakciji sta eksotermni - energija, ki se sprosti, je skoraj 10 eV na kisikov atom. Gostota energijskega toka je torej:

$$P = j \eta W$$

kjer je j gostota toka delcev na površino bakterije, η verjetnost za oksidacijo in W sproščena energija na atom, ki reagira na površini. Z vstavitvijo numeričnih vrednosti dobimo:

$$P = 10^{24} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \times 0,01 \times 10^{-18} \text{ J} = 10^4 \text{ Wm}^{-2}$$

Sprememba notranje energije bakterije je enaka produktu gostote energijskega toka in površine bakterije, enaka pa je tudi produktu mase, specifične toplotne kapacitete in spremembi temperature bakterije:

$$\Delta W = P S = m c_p \Delta T$$

Sprememba temperature bakterije v časovni enoti je torej:

$$\Delta T / \Delta t = \frac{PS}{mc_p} = 10^4 \text{ K / s}$$

Pri tem smo vzeli za površino bakterije  $S = 1 \mu\text{m}^2$ , maso  $m = 10^{-15} \text{ kg}$  in specifično toplotno kapaciteto  $1000 \text{ J kg}^{-1}\text{K}^{-1}$ .

Ubogim bakterijam se torej v kisikovi plazmi slabo piše. Izolirane v plazmi uničimo že v nekaj stotinkah sekunde, za tiste na podlagi pa potrebujemo malo več časa. V zgornjem izračunu smo namreč predpostavili, da je bakterija toplotno izolirana, v resnici pa je površina, s katero se dotika podlage, vendarle končno velika. Termično uničevanje bakterij s kisikovo plazmo je torej odlična metoda, če so bakterije dobro izpostavljene plazmi. Pri tem velja še enkrat omeniti, da je okolica na sobni temperaturi. Ogrevamo samo bakterije!

Žal se mnoge bakterije zadržujejo v režah, kjer je toplotni stik s podlago boljši, predvsem pa je v režah težko zagotoviti zadostno koncentracijo atomov kisika. Zaradi tega je značilni čas za sterilizacijo v kisikovi plazmi reda velikosti 1 ure.

#### 4 Sklep

Povrnimo se k prvotnemu problemu uničevanja bakterij vraničnega prisada. Pisemskih pošilk žal ne moremo sterilizirati v plazmi, ker bi z izpostavo papirja agresivni kisikovi plazmi uničili tudi pismo. Tudi kemijska sterilizacija ni primerna, ker bi verjetno več poštarjev umrlo zaradi zastrupitve s plinom kot okužbe z antraksom. Za sterilizacijo takšnih vzorcev ostaja na voljo le še sterilizacija z elektronskim curkom, vendar dvomimo, da bodo po vseh poštah namestili elektronske pospeševalnike. Ostaja torej le še upanje, da nismo zanimivi naslovniki okuženih poštnih pošilk. Za sterilizacijo prezračevalnih sistemov pa poznamo rešitev: na sisteme bo treba namestiti plazemske generatorje. Idealno bi bilo, če bi sistemi dopuščali izčrpanje do grobega vakuumu, ki je potreben za razpenjanje plazme po dolgih ceveh. Sicer pa obstaja sterilizacija v zraku pri navadnem tlaku, vendar pa je v tem primeru volumen visokodisociirane plazme močno omejen. Še opozorilo: če se namerava kdo ljubiteljsko ukvarjati s plazemsko sterilizacijo, naj se zaveda, da v plazmi nastajajo strupeni radikali, ki jih je treba pred izpustom v zrak katalizirati v neškodljive pline.

#### Literatura

- /1/ Podobnik A, Raznolikost živih bitij, DZS, Ljubljana, 41 (1995)
- /2/ Hren - Vencelj H, Mikrobiologija in epidemiologija, DDU Univerzum, Ljubljana 127 (1984)
- /3/ Likar M, Mikrobiologija, Cankarjeva založba, Ljubljana, 35 (1987)
- /4/ Bar W, de Bar GM, Naumann A, Rusch-Gerdes S, Contamination of bronchoscopes with Mycobacterium tuberculosis and successful sterilization by low-temperature hydrogen peroxide plasma sterilization, AMERICAN JOURNAL OF INFECTION CONTROL 29: (5) 306-311 (2001)
- /5/ Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH, Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms, INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS 226: (1-2) 1-21 (2001)
- /6/ Ferreira SD, Dernel WS, Powers BE, Schochet RA, Kuntz CA, Withrow SJ, Wilkins RM, Effect of gas-plasma sterilization on the osteoinductive capacity of demineralized bone matrix, CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH (388) 233-239 (2001)
- /7/ Moisan M, Barbeau J, Pelletier J, Plasma sterilization - Methods and mechanisms, VIDE-SCIENCE TECHNIQUE ET APPLICATIONS 56: (299) 15-28 (2001)
- /8/ Cariou-Travers S, Darbord JC, Validation of plasma sterilization - The case of Sterrad, VIDE-SCIENCE TECHNIQUE ET APPLICATIONS 56: (299) 34-46 (2001)
- /9/ Koulik P, Krapivina S, Saitchenko A, Samsonov M, Atmospheric plasma sterilization, VIDE-SCIENCE TECHNIQUE ET APPLICATIONS 56: (299) 117-125 (2001)
- /10/ Mendis DA, Busting dust: From cosmic grains to terrestrial microbes, PHYSICA SCRIPTA T89: 173-175 (2001)
- /11/ Holy CE, Cheng C, Davies JE, Shoichet MS, Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering, BIOMATERIALS 22: (1) 25-31 (2001)
- /12/ Ben Gadri R, Roth JR, Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Tsai PPY, Helfrich DJ, Feldman P, Sherman DM, Karakaya F, Chen ZY, Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAugDP), SURFACE & COATINGS TECHNOLOGY 131: (1-3) 528-542 (2000)
- /13/ Kaklugin A, Koulik P, Krapivina S, Norman G, Petrov E, Ricard A, Samsonov M, HF atmospheric plasma sterilization of dielectric containers inside surfaces, Proc. 13<sup>th</sup> Int. Coll. Plasma Processes 28-32 (2001)
- /14/ Subramanyam TK, Schwefel R, Awakovitz P, Plasma sterilization and correlation to plasma diagnostics, Proc. 13<sup>th</sup> Int. Coll. Plasma Processes 33-36 (2001)
- /15/ Moisan M, Barbeau J, Pelletier J, Philip N, Saoudi B, Plasma sterilization: mechanisms, potentials and shortcomings, Proc. 13<sup>th</sup> Int. Coll. Plasma Processes 12-18 (2001)
- /16/ Vesel A, Mozetič M, Behaviour of catalytic probe during surface activation of polyether sulphone VACUUM 61: (2-4) 373-377 (2001)
- /17/ Babič D, Poberaj I, Mozetič M, Fiber optic catalytic probe for weakly ionized oxygen plasma characterization REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 72: (11) 4110-4114 (2001)
- /18/ Mozetič M, Zalar A, Panjan P, Bele M, Pejovnik S, Grmek R, A method of studying carbon particle distribution in paint films, THIN SOLID FILMS 376: (1-2) 5-8 (2000)